

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 01-104087

(43)Date of publication of application : 21.04.1989

(51)Int.CI.

C07G 17/00  
 A61K 35/70  
 C12P 1/02  
 //C12P 1/02  
 C12R 1:645 )

(21)Application number : 63-050092

(71)Applicant : YOSHITOMI PHARMACEUT IND LTD  
TAITO KK

(22)Date of filing : 02.03.1988

(72)Inventor : FUJITA TETSUO  
TOYAMA RYOSUKE  
SASAKI SHIGEO  
OKUMOTO TAKEKI  
CHIBA KENJI

(30)Priority

Priority number : 62 62215 Priority date : 17.03.1987 Priority country : JP

## (54) PRODUCTION OF IMMUNOSUPPRESSIVE SUBSTANCE

(57)Abstract:

**PURPOSE:** To obtain an immunosuppressive substance having excellently immunosuppressive action, even developing no excessive cytotoxicity, from a culture mixture obtained by cultivating a fungus belonging to the genus *Isaria*, capable of producing an immunosuppressive substance.

**CONSTITUTION:** First, a fungus [e.g. *Isaria sinclairii* (ATCC No.24400)] belonging to the genus *Isaria* is cultivated preferably by aerobic submerged culture. Then an immunosuppressive substance is collected from the culture mixture by a well-known method. The culture temperature is preferably 25W30° C.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the  
examiner's decision of rejection or application  
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of  
rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision  
of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C): 1998,2003 Japan Patent Office

## ⑫ 公開特許公報 (A)

平1-104087

⑬ Int.Cl.

C 07 G 17/00  
A 61 K 35/70  
C 12 P 1/02  
//(C 12 P 1/02  
C 12 R 1:645)

識別記号

ABC

府内整理番号

8318-4H  
8213-4C  
Z-6807-4B

⑭ 公開 平成1年(1989)4月21日

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全14頁)

## ⑮ 発明の名称 免疫抑制物質の製造法

⑯ 特願 昭63-50092

⑰ 出願 昭63(1988)3月2日

優先権主張 ⑪ 昭62(1987)3月17日 ⑬ 日本 (JP) ⑯ 特願 昭62-62215

⑮ 発明者	藤多哲郎	京都府向日市鶴冠井町戸所41番地32
⑮ 発明者	遠山良介	兵庫県神戸市西区桜が丘中町2丁目4番8号
⑮ 発明者	佐々木重夫	兵庫県神戸市須磨区飛松町5丁目5番1号
⑮ 発明者	奥本武城	東京都中野区東中野5丁目23番6号1014
⑮ 発明者	千葉健治	東京都東久留米市小山3丁目6番14号 こやま台エレガン トハウス105号
⑯ 出願人	吉富製薬株式会社	大阪府大阪市東区平野町3丁目35番地
⑯ 出願人	台糖株式会社	東京都中央区日本橋本町4丁目13番5号
⑯ 代理人	弁理士高島一	

## 明細書

## 1. 発明の名称

免疫抑制物質の製造法

## 2. 特許請求の範囲

- (1) イザリア属に属する免疫抑制物質生産菌を培養し、培養物から免疫抑制物質を採取することを特徴とする免疫抑制物質の製造法。
- (2) 免疫抑制物質がマイリオシンである請求項(1)記載の免疫抑制物質の製造法。
- (3) 免疫抑制物質生産菌がイザリア属シンクレィリー菌であることを特徴とする請求項(1)または(2)記載の免疫抑制物質の製造法。

## 3. 発明の詳細な説明

## 〔産業上の利用分野〕

本発明は、微生物を用いた免疫抑制物質、就中マイリオシンの新しい製造法に関する。

## 〔従来の技術〕

従来、微生物由来の免疫抑制物質はシリンドロカルボン (Cylindrocarpon) 属、トリボクラジウム (Tolypocladium) 属またはフザリウム

(Fusarium) 属に属する免疫抑制物質生産菌を培養することにより製造できることが知られている。特に、トリボクラジウム属から生産されるシクロスボリンは臓器移植の際の拒絶反応防止に広く用いられている。

## 〔発明の目的〕

本発明者らは、このような事情に鑑み、免疫抑制物質の生産菌を探索した結果、従来免疫抑制物質を生産することが知られていないある属に属する微生物から免疫抑制物質生産菌を見出し、本発明に到達した。

## 〔発明の構成〕

すなわち、本発明の要旨はイザリア (Isaria) 属に属する免疫抑制物質生産菌を培養し、培養物から免疫抑制物質を採取することを特徴とする免疫抑制物質の製造法に関する。

以下に本発明を詳細に説明する。

本発明方法で使用される微生物はイザリア属に属し、培養物中に充分な量の免疫抑制物質を生産しうる能力を有する免疫抑制物質生産菌である。

このような菌株としては、たとえば、イザリア属に属するシンクレイリー (sinclairii) 菌が挙げられ、アメリカン・タイプ・カルチュア・コレクション (American Type Culture Collection) に *Isaria sinclairii* ATCC No.24400 として寄託されている。

本発明に用いる免疫抑制物質生産菌はこの菌株に限定されるものではなく、たとえば、常用される紫外線、高周波放射線、薬品などによる人工変異手段で変更された変異株を含むことは勿論である。

本発明に用いる免疫抑制物質生産菌は通常のかび用栄養源を含む種々の培養基で培養される。たとえば、炭素源としてグルコース、澱粉、グリセリン、糖水あめ、デキストリン、蜂蜜、マルトースなど、および窒素源としてコーンスティーブリカ、ペプトン、イーストエキス、ジャガイモ煎汁、肉汁、大豆粉、小麦胚芽、硝酸カリウム、硝酸ナトリウム、硫酸アンモニウム、アミノ酸などがあげられ、その他通常の無機塩および菌の発

育を助け、免疫抑制物質の生産を促進する有機および無機物や消泡剤などの培養に常用される添加剤を適当に加えることができる。

培養法は特に限定されるものではないが、好気的な深部培養法が適している。培養に適当な温度は20~35℃、好適には25~30℃で培養する。

本発明方法により培養物中に生産された免疫抑制物質は抽出、吸着など常用される操作を必要に応じて適宜組み合わせ、培養物中より取り出される。たとえば、培養液から菌体などの不溶物を通過、遠心分離などの方法で分離し、培養液をアンバーライト XAD-2 に通液させ、免疫抑制物質を吸着させることによって取り出される。かくして得られた免疫抑制物質をさらに、たとえば、メタノールで溶出させ、溶出部を更に逆相クロマトグラフィーにかけて、分離することによって免疫抑制物質の高度精製物が得られる。

かくして得られた高度精製免疫抑制物質は、ミリオコツカム・アルボミセス (*Myrococcum*

*albomyces*) およびマイセリア・ステリリア (*Mycelia sterilia*) 等の菌からも産生されるマイリオシン (*Myroicin*)、別名サーモフィミシディン (*Thermophymocidin*) (米国特許第3,928,572号明細書参照) であることを、NMR、紫外線吸収スペクトル、赤外線吸収スペクトル、マス分析等より推認した。この物質もまた強い免疫抑制活性を持つものである。

#### 〔作用〕

本発明により、生産される免疫抑制物質は優れた免疫抑制作用を示しヒト、ウシ、ウマ、イス、マウス、ラットなどの哺乳動物に対して、たとえば臓器や骨髄移植の際の拒絶反応の抑制剤やエリテマトーデス、関節リウマチ、アレルギーなどの自己免疫疾患またはリンパ球増殖異常に基づく疾患などにおける予防または治療剤として、あるいは医学・薬学における試薬として用いることができる。

上記医薬として、本発明の免疫抑制物質を用いる場合には担体、賦形剤、希釈剤などと混合して

散剤、カプセル剤、錠剤、注射剤などに製剤化して患者に投与することができる。また、凍結乾燥させてもよい。

その投与量は、疾患、症状、体重、性別、年齢などによって変わりうるが、たとえば腎移植における拒絶反応の抑制には通常、成人1日当たり0.1~1.0mg (力値) を1日1~数回に分けて投与される。

#### 〔実施例〕

以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はその要旨を超えない限り以下の実施例により何等の限定も受けるものではない。なお、免疫抑制物質の活性測定は、下記の方法で行なった。

免疫抑制物質の活性測定法としては、マウス、ラットあるいはヒトのリンパ球を用いた種々の免疫反応を用いることができるが、たとえば、本発明の免疫抑制物質は、マウス、ラット、ヒトの同種リンパ球混合反応 (同種MLR) を用いることにより、感度よく測定できる。同種MLRとは、

同種でしかも主要組織適合性抗原が異なる2個体由来のリンパ球、たとえば、脾細胞、リンパ節細胞、末梢血リンパ球などを混合培養することによって誘導されるリンパ球の幼若化反応である。この同種MLRは、リンパ球の供与者間の主要組織適合性抗原の違いを反映し、誘導される現象でありたとえば、一卵性双生児のリンパ球の混合培養によるリンパ球の幼若化現象は認められない。そこで、同種MLRはたとえば、臓器移植における供与者-受容者の選択に広く用いられている方法である。

通常、同種MLRを行なう場合には、一方のリンパ球をX線照射あるいはマイトイシンC処理などを行なうことによって、分裂増殖を阻止した状態で刺激細胞として用い、他方のリンパ球(反応細胞)の幼若化反応を測定する方法( one way-MLR)を用いることができる。

さらに、本発明の免疫抑制物質の活性は、同種MLRの際に誘導される主要組織適合性抗原拘束性を有する細胞障害性T細胞の誘導を抑制する活性

性としても測定することができる。

また、本発明の免疫抑制物質の活性は、同種MLRの他に、種々のマイトイシン(コンカナバリンA、フィトヘマグルチニン、ポークウィードマイトイシンなど)の刺激により誘導されるリンパ球の幼若化反応を抑制する活性、または、T細胞、B細胞などのリンパ球の分裂増殖を増強もしくは分化を促進する活性を有するようなサイトカイン(インターロイキン1、2、3、4、5、6など)により誘導されるリンパ球の分裂増殖反応、または機能の誘導活性を抑制する活性としても評価することができる。さらにこれらサイトカインのT細胞、マクロファージなどからの産生を抑制する活性として評価することが可能である。

さらに、本発明の免疫抑制物質はマウスなどに腹腔内、経口、静脈内または皮内投与をすることによって、たとえば、異種赤血球などであらかじめ免疫されたマウスの脾細胞内に誘導される抗異種赤血球抗体を産生する形質細胞の誘導を抑制する活性、または同種マウスの皮膚移植により誘導

される移植片対宿主反応、あるいは遅延型アレルギー、アジュバント関節炎などを抑制する活性としても評価することができる。

また、自己免疫疾患のモデルマウスであるMR/L/2pr.マウス、NZB/WF1マウス、BXSBマウスなどに本発明の免疫抑制物質を投与することにより、たとえば、抗DNA抗体の産生、リウマチ因子の産生、腎炎、リンパ球の増殖異常などの抑制活性あるいは延命効果としても評価することができる。

#### 〔実施例〕

##### 実施例1(シンクレイリー菌株のジャーパー培養)

GPY培地(1Lあたり、グリコース30g、ペプトン5g、酵母エキス3g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3g、pH5.5)を500mL容首長振盪フラスコ2本に100mLずつ分注し、121℃、20分間オートクレーブで滅菌後、ポテトデキストロース寒天培地上で成育したイザリア・シンクレイリー ATCC No.24400の菌糸体の約1cmを各フラスコに接種し、25℃、

6日間往復振盪培養(145 rpm、振幅8cm)を行なった。得られた培養液を種母として上記のGPY培地5Lを仕込んだ10L容ジャーファーメンタに接種し、25℃、10日間、通気搅拌培養(1VVM、300 rpm)を行なった。

##### 実施例2(シンクレイリー菌の培養液からの免疫抑制物質の採取)

実施例1で得られた培養液4.5Lから遠心により菌体および不溶物を除き、培養液4.0Lを得た。得られた培養液をアンバーライトXAD-2(Φ40mm×750mm)に通液し、免疫抑制物質を吸着させた。さらに水4Lを通液し洗浄した。その後メタノール6Lを通液し、免疫抑制物質を溶出させた。これを減圧濃縮後、酢酸エチル200mLに溶解し、水200mLで3回分液漏斗にて抽出した。

水抽出部および酢酸エチル部それぞれを減圧濃縮後、凍結乾燥して免疫抑制物質2.23gおよび0.34gをそれぞれ得た。

##### 実施例3(マイリオシンの採取)

実施例2で得られた水抽出部を凍結乾燥して得られた免疫抑制物質2.23gを5mlの水で溶解し、逆相クロマトグラフィー(ODS DM-1020T フジーデビソン ケミカル社製)カラム(φ30mm×h85mm)にかけた。水にて溶出を開始し、漸次メタノールの濃度を上げながら溶出し、分画を行なった。70%メタノール溶出部を減圧下濃縮乾固した後、少量の熱メタノールに溶解し、放冷によりマイリオシンの結晶を析出させた。本析出結晶を再度熱メタノールに溶かし、再結晶操作を行ない純粋なマイリオシン4.0mgを得た。

(実験例)

実験例1 (採取免疫抑制物質の免疫抑制作用の測定)

本発明の免疫抑制物質の活性の測定は、マウス同種リンパ球混合反応(以下、MLRと称することもある。)を用いて行なった。マウス同種MLRは、反応細胞としてBALB/cマウス(H-2<sup>a</sup>)の脾細胞を、刺激細胞としてC57BL/6(H-2<sup>b</sup>)のマウス脾細胞をマイトイシン

なった。3回洗浄後、10<sup>-4</sup>M:2-メルカブトエタノールおよび20%FCSを含むRPMI1640培地を用いて、10<sup>7</sup>個/mlに調製し、刺激細胞浮遊液として用いた。

上述した方法により調製した反応細胞浮遊液50μlと刺激細胞浮遊液50μlおよび被検体液100μlとを、96穴マイクロテストプレートに加え、37℃で5%炭酸ガスの条件下で4日間培養を行なった。

リンパ球の幼若化反応の測定方法としては、MTT([(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide])を用いる色素定量法および<sup>3</sup>H-チミジンの取り込みを指標とする方法を用いた。

1) MTTを用いる色素定量法

培養終了後、各wellの上清100μlを除去し、5mg/mlMTT溶液を20μlずつ各wellに添加し、4時間、37℃でインキュベートした。その後、10%ドデシル硫酸ナトリウムを含む0.01規定塩酸溶液100μlを加え、一晩37℃でイ

C処理したものを用い、等比で混合培養することによって行なった。

反応細胞の調製法としては、以下の方法で行なった。5~6週齢の雄性BALB/cマウスより脾臓を摘出し、熱不活化牛胎児血清(以下、FCSと称することもある。)を5%添加した RPMI1640培地(硫酸カナマイシン60μg/ml、L-グルタミン2mM、N-2-ヒドロキシエチルペラジン-N'-2-エタンスルホネート(HEPES)10mM、0.1%炭酸水素ナトリウム含有)を用いて、脾細胞の単細胞浮遊液を得た。溶血処理後、10<sup>-4</sup>M:2-メルカブトエタノールおよび20%FCSを含むRPMI1640培地を用いて、10<sup>7</sup>個/mlに調製し、反応細胞浮遊液として用いた。

刺激細胞の調製法は以下の方法で行なった。5~6週齢の雄性C57BL/6マウスより脾臓を摘出し、RPMI1640培地を用いて脾細胞の単細胞浮遊液を得た。溶血処理後、40μg/mlマイトイシンCで37℃、60分間の処理を行

ンキュベートし、形成された紫色のホルマゾンの結晶を溶解させ、マイクロプレート吸光光度計を用いて550nmにおける吸光度を測定し、マウス同種MLRのリンパ球幼若化反応の指標とした。マウス同種MLRの抑制は以下の式により抑制率を算出することにより評価した。

$$\text{抑制率} (\%) = \left[ 1 - \frac{\frac{\text{被検体を添加したMLRの吸光度}}{\text{被検体未添加したMLRの吸光度}} - 1}{\frac{\text{被検体未添加したMLRの吸光度}}{\text{反応細胞のみの吸光度}} - 1} \right] \times 100$$

2) <sup>3</sup>Hチミジン取り込みを指標とする方法

培養終了後に、<sup>3</sup>Hチミジン0.5μCi/wellを添加し、4時間培養後、セルハーベスターにて細胞を収集し、細胞内に取り込まれた放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定し、マウス同種MLRのリンパ球幼若化の指標とした。マウス同種MLRの抑制は、以下の式により抑制率を算出し評価した。

(以下余白)

$$\text{抑制率} = \left[ 1 - \frac{\frac{\text{被検体を添加したMLRの反応細胞のみのcpm}}{\text{被検体未添加のMLRの反応細胞のみのcpm}}}{\frac{\text{被検体を添加したMLRの反応細胞のみのcpm}}{\text{被検体未添加のMLRの反応細胞のみのcpm}}} \right] \times 100$$

活性は認められなかった ( $IC_{50}$  は  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  以上である)。

(以下余白)

本発明の免疫抑制物質はメタノールに懸濁後、  
RPMI 1640 培地で希釈し、10および $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の最後濃度で用いた。なお、メタノール  
は、最終濃度が0.1%以下で用い、この場合には、  
同種MLRに全く影響が認められなかった。

本発明の免疫抑制物質（水抽出液分および酢酸  
エチル抽出液分）について、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ から $10^{-4} \mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲の最後濃度で、マウス同種MLR  
におけるリンパ球幼若化反応の抑制活性を測定した  
結果、第1表に示すように、本発明の免疫抑制  
物質（酢酸エチル抽出）のマウス同種MLRを50  
%抑制する濃度 ( $IC_{50}$ ) は  $1.6 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{ml}$   
であり、水抽出の免疫抑制物質の  $IC_{50}$  は  $2.5 \times 10^{-1} \mu\text{g}/\text{ml}$ であることが明らかとなった。

一方、これらの免疫抑制物質は、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$   
の濃度でも、マウスL929細胞などに対する細胞

第1表

反応細胞	刺激細胞	被検体	用量 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	OD <sub>540</sub>	抑制率 (%)
BALB/c	C57BL/6	免疫抑制物質 (酢酸エチル抽出)	1.0 $\times 10^{-1}$	0.157	38
BALB/c	C57BL/6	免疫抑制物質 (酢酸エチル抽出)	1.0 $\times 10^{-1}$	0.029	47
BALB/c	C57BL/6	免疫抑制物質 (酢酸エチル抽出)	1.0 $\times 10^{-1}$	0.571	66
BALB/c	C57BL/6	免疫抑制物質 (酢酸エチル抽出)	1.0 $\times 10^{-1}$	0.412	84
BALB/c	C57BL/6	免疫抑制物質 (酢酸エチル抽出)	1.0 $\times 10^{-1}$	0.377	87
BALB/c	C57BL/6	免疫抑制物質 (酢酸エチル抽出)	1.0 $\times 10^{-1}$	0.298	91
BALB/c	C57BL/6	免疫抑制物質 (酢酸エチル抽出)	1.0 $\times 10^{-1}$	0.223	95
BALB/c	C57BL/6	免疫抑制物質 (水抽出)	1.0 $\times 10^{-1}$	1.0	100
BALB/c	C57BL/6	免疫抑制物質 (水抽出)	1.0 $\times 10^{-1}$	0.118	12
BALB/c	C57BL/6	免疫抑制物質 (水抽出)	1.0 $\times 10^{-1}$	0.522	24
BALB/c	C57BL/6	免疫抑制物質 (水抽出)	1.0 $\times 10^{-1}$	0.472	26
BALB/c	C57BL/6	免疫抑制物質 (水抽出)	1.0 $\times 10^{-1}$	0.463	33
BALB/c	C57BL/6	免疫抑制物質 (水抽出)	1.0 $\times 10^{-1}$	0.434	81
BALB/c	C57BL/6	免疫抑制物質 (水抽出)	1.0 $\times 10^{-1}$	0.236	85
BALB/c	C57BL/6	免疫抑制物質 (水抽出)	10.0	0.221	

#### 実験例2 (マイリオシンの免疫抑制作用の測定)

実験例1と同様にしてマイリオシンの免疫抑制作用を<sup>3</sup>H-チミジン取り込みを指標とする方法  
により測定し、その結果を第2表に示した。なお、  
マイリオシンはメタノールに懸濁した。また、メ  
タノールの最終濃度は0.05%以下で用い、この  
場合には同種MLRに全く影響が認められなかっ  
た。

第2表に示した結果に基づきマイリオシンのマ  
ウス同種MLRに対する  $IC_{50}$  値はシクロスボリ  
ンAの  $10^{-3}$  以下であることが明らかとなった。

(以下余白)

実験例3 (マイトジエン刺激によるマウス脾細胞  
幼若化反応の抑制効果)

フィトヘムアグルチニン (PHA) またはポークウイードマイトジエン (PWM) 刺激によるマウス脾細胞幼若化反応に対する効果の試験は、以下の方法で行なった。

5~8週齢の雄性BALB/cマウスより脾臓を摘出し、5%熱不活性牛胎児血清を添加した RPMI 1640 培地を用いて脾細胞の単細胞浮遊液を得た。溶血処理後、 $10^{-4}$ M 2-メルカプトエタノールおよび2.0%熱不活性牛胎児血清を含む RPMI 1640 培地を用いて  $5 \times 10^6$ /ml に調製し PHA または PWM を添加した。この細胞浮遊液  $100 \mu l$  をあらかじめ被検液  $100 \mu l$  を入れておいた96穴マイクロテストプレートの各ウエルに加えた (マウス脾細胞の数は  $5 \times 10^3$  個/ウエルである)。37°C、5%炭酸ガス条件下で72時間培養した後、 $^3\text{H}$ -チミジン  $0.5 \mu \text{Ci}/\text{ウエル}$  を加え、同条件下でさらに4時間培養した。培養終了後、セルハーベスターを用いて

第2表

反応細胞	刺激細胞	被検体	用量 ( $\mu \text{g}/\text{ml}$ )	$^3\text{H}$ -チミジン取り込み (cpm)	抑制率 (%)
BALB/c	-	-	-	1179	-
-	C57BL/6	-	-	148	-
BALB/c	C57BL/6	-	-	2662	-
BALB/c	C57BL/6	マイリオシソ 1.0 $\times 10^{-4}$	4275	87.8	
		1.0 $\times 10^{-3}$	4535	86.7	
		1.0 $\times 10^{-2}$	2208	95.9	
		1.0 $\times 10^{-1}$	1165	100.0	
		1.0	1149	100.0	
		10.0	1142	100.0	

細胞を回収し、細胞内に取り込まれた放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定し、マウス脾細胞幼若化反応の指標とした。その結果を第3表に示す。

(以下余白)

第3表

マイトジエン	被検体	用量 ( $\mu \text{g}/\text{ml}$ )	$^3\text{H}$ -チミジン取り込み (cpm)	抑制率 (%)
-	-	-	2478	-
PHA(10 $\mu \text{g}/\text{ml}$ )	-	-	19502	-
PHA(10 $\mu \text{g}/\text{ml}$ ) + 免疫抑制物質	0.01	4170	90.1	
	0.1	4963	85.4	
	1.0	6755	74.9	
	10.0	6227	78.0	
	50.0	2457	100.0	
-	-	-	26240	-
PHA(1/100)	-	-	14841	48.0
PHA(1/100) + 免疫抑制物質	0.01	9567	70.2	
	0.1	9567	70.2	
	1.0	12199	59.1	
	10.0	7587	78.5	
	50.0	3665	95.0	

第3表から明らかなように本発明の免疫抑制物質は同物質を含まない対照に比して、PHAあるいはPWMによって誘導される<sup>3</sup>H-チミジン取り込みを強く抑制した。

実験例4 (ラット脾細胞コンカナバリンA (Con A) 刺激培養上清のインターロイキン2 (IL2) により誘導されるIL2依存性マウス細胞株、CTLL-2の<sup>3</sup>H-チミジン取り込みに対する抑制効果)

IL2依存性マウス細胞株CTLL-2を30%牛胎児血清を含むRPMI1640培地にて2×10<sup>5</sup>個/皿に調製した。この細胞浮遊液50μlと、IL2を含むラット脾細胞Con A 刺激培養上清50μlをあらかじめ被検液100μlを入れておいた96穴マイクロテストプレートの各ウェルに加えた。37℃、5%炭酸ガス条件下で20、44および68時間培養した後、<sup>3</sup>H-チミジン0.5μCi/ウェルを加え、さらに同条件下で4時間培養した。培養終了後、セルハーベス

ターを用いて細胞を回収し、細胞内に取り込まれた放射活性を液体シンチレーションカウンターを用いて測定した。その結果を第4表に示す。

(以下余白)

第4表

培養時間	IL2	被検体	用量 (μg/ml)	<sup>3</sup> H-チミジン 取り込み量 (cpm)	抑制率 (%)
24時間	-	-	-	183	-
	-	免疫抑制物質	0.1	8859	49.8
	-		1.0	4541	46.1
	-		10.0	4860	59.0
	-		100	3742	-
48時間	-	免疫抑制物質	0.1	3511	76.0
	-		1.0	918	82.4
	-		10.0	700	88.9
	-		100	478	-
72時間	-	免疫抑制物質	0.1	216	96.7
	-		1.0	53334	97.9
	-		10.0	1996	99.2
	-		100	1315	-
	-		1000	6666	-

(表中、「+」はIL2存在を、「-」はIL2不存在を意味する。)

第4表から明らかなように、本発明の免疫抑制物質は、IL2により誘導されるCTLL-2細胞の<sup>3</sup>H-チミジン取り込みの上界を強く抑制した。

実験例5 (マウス同種リンパ球混合培養 (MLC) におけるIL2産生に対する抑制効果)

マウス同種MLCは次のように行なった。すなわち、実験例1と同様に調製された反応細胞浮遊液および刺激細胞浮遊液をそれぞれ0.5皿ずつ、あらかじめ被検液1皿を入れておいた24穴マルチディッシュに加え、37℃、5%炭酸ガス条件下で3日間培養した。培養終了後、上清を回収してマウス同種MLCの上清とした。

マウス同種MLCの上清中のIL2活性の測定は次のように行なった。すなわち、IL2依存性マウス細胞株CTLL-2を30%熱不活化牛胎児血清を含むRPMI1640培地にて10<sup>5</sup>個/皿に調製し、あらかじめ上記MLCの上清を100μl入れておいた96穴マイクロテストプレートの各ウェルに100μlずつ加えた。37℃、5

5%炭酸ガス条件下で20時間培養した後、<sup>3</sup>H-チミジン0.5 μCi/ウェルを加え、さらに同条件下で4時間培養した。培養終了後、セルハーベスターを用いて細胞を回収し、細胞内に取り込まれた放射活性を液体シンチレーションカウンターを用いて測定し、IL2活性の指標とした。その結果を第5表に示す。

〔以下余白〕

第5表

試料	IL2活性	
	<sup>3</sup> H-チミジンの 抑制率	取り込み量 (cpm) (%)
RPM1640培地	—	154
無処理 HLCの上清	—	5339
免疫抑制物質 0.01μg/μl処理 HLCの上清	3007	45.0
免疫抑制物質 0.1μg/μl処理 HLCの上清	3153	42.2
免疫抑制物質 1.0μg/μl処理 HLCの上清	1370	76.5

第5表に示したように本発明の免疫抑制物質はマウス同種MLCにおけるIL2産生を抑制することが示唆された。

実験例6 (マウス同種リンパ球混合培養 (MLC) により誘導される同種細胞障害性T細胞に対する抑制効果)

実験例1と同様の方法にて調製したBALB/cマウス (H-2<sup>d</sup>) 脾細胞浮遊液 (2 × 10<sup>7</sup>個/ml) 0.5 mlと、マイトイシンC処理したC57BL/6マウス (H-2<sup>d</sup>) 脾細胞浮遊液 (2 × 10<sup>7</sup>個/ml) 0.5 mlおよび被検体1.0 mlを2.4穴マルチディッシュに加え、37℃で5%炭酸ガスの条件下で6日間培養を行なった。

培養終了後、遠心により細胞を回収し、10%FCSを含むRPM11640培地にて5 × 10<sup>4</sup> ~ 6.25 × 10<sup>4</sup>個/mlに調製し、奏効細胞として用いた。

標的細胞としては、刺激細胞と同系 (H-2<sup>d</sup>) のC57BL/bマウス由来白血病細胞、EL4細胞を用いた。EL4細胞10<sup>4</sup>個を100 μCiの

Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> (1 mCi/ml) を用いて、37℃にて1時間インキュベートすることにより<sup>51</sup>Crを細胞質内に取り込ませた後、洗浄し、10<sup>4</sup>個/mlに調製し、標的細胞として用いた。

細胞障害活性の測定は、奏効細胞浮遊液0.1 mlと、標的細胞浮遊液0.1 mlを、96穴平底プレートに加え、37℃にて4時間培養した後、上清中に放出される<sup>51</sup>Cr量を測定し、以下の式により細胞障害活性を算出した。

$$\text{細胞障害活性} (\%) = \left[ \frac{\text{奏効細胞} + \text{標的細胞}}{\text{細胞, cpm}} - \frac{\text{標的細胞}}{\text{細胞, cpm}} \right] \times 100$$

なお、上記方法により誘導された細胞障害性T細胞は、刺激細胞 (H-2<sup>d</sup>) と同系のEL4細胞 (H-2<sup>d</sup>) に対しては強い細胞障害活性を示したが、異系のMeth A細胞 (H-2<sup>a</sup>) に対しては全く細胞障害活性を示さなかったことから、H-2<sup>d</sup>拘束性の同種細胞障害性T細胞であることが示唆された。

本発明の免疫抑制物質を0.01 ~ 1 μg/mlの

濃度で添加し、同種細胞障害性T細胞の誘導に対する影響を検討した結果、第6表に示す様に、細胞障害活性がほとんど認められず、本発明の免疫抑制物質によって、同種細胞障害性T細胞の誘導は著しく抑制された。

(以下余白)

第6表

被検体	$^{31}\text{Cr}$ 放出量 (cpm)	細胞障害活性 (%)
標的細胞全放射活性	7008	-
標的細胞単独	2253	0
殺効細胞+標的細胞 (100:1)	4319	43.4
(50:1)	3184	19.6
(25:1)	2706	9.5
殺効細胞+標的細胞 (100:1) 免疫抑制物質0.01μg/ml	2073	0
(50:1)	0.01μg/ml	2141
(25:1)	0.01μg/ml	2121
殺効細胞+標的細胞 (100:1) 免疫抑制物質0.1μg/ml	2003	0
(50:1)	0.1μg/ml	2062
(25:1)	0.1μg/ml	2135
殺効細胞+標的細胞 (100:1) 免疫抑制物質 1μg/ml	2021	0
(50:1)	1μg/ml	2286
(25:1)	1μg/ml	2238

実験例7 (インターロイキン3 (IL3) により誘導されるIL3依存性マウス細胞株FDCP2の増殖に対する抑制効果)

IL3依存性マウス細胞株FDCP2を10%牛胎児血清を含むRPMI1640培地にて2×10<sup>5</sup>個/mlに調製した。この細胞浮遊液100μlとIL3を含むマウス白血病細胞WEHI3培養上清50μlを、あらかじめ被検体100μlを入れておいた96穴マイクロテストプレートの各ウエルに添加し、37℃にて5%炭酸ガスの条件下で20時間培養した。培養終了後、<sup>3</sup>H-チミジン0.5μCi/ウエルを加え、さらに同条件下で4時間培養した後、セルハーベスターにより細胞を回収し細胞内に取り込まれた放射活性を液体シンチレーションカウンターを用いて測定し、IL3依存性増殖の指標とした。

第7表に示したように、本発明の免疫抑制物質は、IL3により誘導されるFDCP2細胞の<sup>3</sup>H-チミジン取り込みの上昇を(1μg/mlの濃度で約60%程度)抑制することから、IL3依存性

の増殖を抑制する活性を本発明の免疫抑制物質は有していることが示唆された。

第7表

IL3	被検体	用量 (μg/ml)	<sup>3</sup> H-チミジン 取り込み量 (cpm)	抑制率 (%)
-	-	-	1719 ± 439	-
+	-	-	16211 ± 629	-
+	免疫抑制物質	10	2179 ± 197	96.8
+	免疫抑制物質	1	7082 ± 350	63.0
+	免疫抑制物質	0.1	11526 ± 150	32.3
+	免疫抑制物質	0.01	11838 ± 378	30.2

(表中、「+」はIL3存在を、「-」はIL3非存在を意味する。)

実験例8 (マウス胸腺細胞のインターロイキン1 (IL1) 応答に対する抑制効果)

雄性7週齢C3H/H<sub>N</sub>Nマウスより胸腺を摘出し、無血清RPMI1640培地を用いて単一細胞浮遊液とした。同培地で3回洗浄した後、20

%牛胎児血清  $5 \times 10^{-3}$  M / 2-メルカブトエタノール、 $2 \times 10^{-3}$  M / L-グルタミン、 $1 \times 10^{-3}$  M ピルビン酸ナトリウムフィトヘムアグロチニン (PHA、ウェルカム社、HA16/17) 1  $\mu$ g / 或およびヒト・ウルトラビュア・インターロイキン1 (ゲンサイム社GUPi-1) 2 単位 / 或を含む RPMI 1640 培地中に  $1.5 \times 10^{-7}$  細胞 /  $\mu$ l と本発明の免疫抑制物質またはサイクロスボリンAを含む溶液  $100 \mu$ l とを 96 ウエル平底マイクロテストプレートの各ウエル中で混合し、37°C、5%炭酸ガス条件下で 66 時間培養した後、 $^3$ H-チミジンを  $0.5 \mu$ Ci / ウエル加えさらに 6 時間培養した。培養終了後、マルチブルセル・ハーベスターを用いて各ウエルの細胞をフィルター上に回収し、細胞中に取り込まれた放射活性をトルエンベースシンチレーターを用いた液体シンチレーション法により測定した。

上述の方法により得られた結果を第8表に示す。表中、SDは標準偏差を表す。また、抑制率(

%) は以下の式により算出した。

抑制率 (%) =

$$1 - \left[ \frac{\left( \frac{\text{PHA+IL1} \text{ 被検液を} \\ \text{加えた際の} ^3\text{H-チミジン}}{\text{取り込み}} \right) - \left( \frac{\text{PHA単独の}}{\text{取り込み}} \right)}{\left( \frac{\text{PHA+IL1の}}{\text{取り込み}} \right) - \left( \frac{\text{PHA単独の}}{\text{取り込み}} \right)} \right] \times 100$$

第8表

被検液	濃度 ( $\mu$ g / ml)	$^3$ H-チミジン 取り込み (cpm $\pm$ SD)	抑制率 (%)
—	—	1389 $\pm$ 42	—
PHA	—	3270 $\pm$ 316	—
PHA+IL1	—	11803 $\pm$ 1740	0
+免疫抑制物質			
2		3973 $\pm$ 39	91.8
0.2		4646 $\pm$ 826	83.9

第8表に示した様に、本発明の免疫抑制物質は、濃度依存的な IL1 応答抑制作用を示した。

#### 実験例9 (マウス脾臓細胞のインターロイキン6

(IL6) 応答に対する抑制効果)

雄性 8 週齢 BALB/c マウスより脾臓を摘出し無血清 RPMI 1640 培地を用いて単一細胞浮遊液を得た後、遠心 (1000 rpm、5 分) により細胞塊を形成させた。これに 0.16 M 塩化アンモニウム溶液と 0.17 M トリス溶液 (pH 7.65) を 9 対 1 の比率で混合した溶液を加えることにより赤血球を溶解させた後、無血清 RPMI 1640 培地で 3 回洗浄した。得られた細胞を 20%牛胎児血清、 $5 \times 10^{-3}$  M / 2-メルカブトエタノール、 $2 \times 10^{-3}$  M / L-グルタミン  $1 \times 10^{-3}$  M ピルビン酸ナトリウムおよびインターロイキン6の供給源としての T24ヒト膀胱癌細胞株培養上清 25% を含む RPMI 1640 培地中に  $5 \times 10^6$  細胞 /  $\mu$ l と本発明の免疫抑制物質またはサイクロスボリンAを含む溶液  $100 \mu$ l とを 96 ウエル平底マイクロテストプレートの各ウエル中で混合し、37°C、5%炭酸ガス条件下で 72 時間培養した。培養終了後、各ウエルから細胞浮遊液  $50 \mu$ l を回

収し、0.7%アガロースゲルを含む RPMI 1640 培地  $300 \mu$ l、40%プロテインA結合羊赤血球を含む生理食塩水  $20 \mu$ l やり生理食塩水で 300 倍に希釈した抗マウス IL6 抗血清  $20 \mu$ l を試験管内で混合した後、ローダック・プレート (ファルコン社 1034) 上で均一に伸展させた。室温に数分間放置しゲルが固った後に、37°C、5%炭酸ガス条件下で約 4 時間インキュベートした。

無血清 RPMI 1640 培地で 40 倍に希釈したモルモット補体を各プレートに  $300 \mu$ l 加え、さらに 2 時間インキュベートした後に、形成されたブラーク数を実体顕微鏡下で算定した。

上述の方法により得られた結果を第9表に示す。表中、SDは標準誤差を表す。また、抑制率(%)は以下の式により算出した。

$$\text{抑制率} (\%) = \left[ 1 - \frac{\left( \frac{\text{IL6+IL被} \\ \text{検液添加}}{\text{時のブラーク数}} \right) - \left( \frac{\text{非添加}}{\text{時のブラーク数}} \right)}{\left( \frac{\text{IL6 単独}}{\text{添加時の}} \right) - \left( \frac{\text{IL6 非添加}}{\text{時のブラーク数}} \right)} \right] \times 100$$

第9表に示した様に、本発明の免疫抑制物質は、濃度依存的なIgG応答抑制作用を示した。

実験例10 (マウスの抗羊赤血球抗体産生に対する抑制効果)

雄性7~8週齢BALB/cマウスを羊赤血球(SRBC)で免疫した後、3または4日に脾臍を摘出し、ブラーク形成細胞(PFC)数を測定することにより、抗羊赤血球抗体産生に対する抑制効果を以下の様に検討した。

実験1：

免疫実施日の3日前から免疫当日まで本発明の免疫抑制物質を2mg/kgの用量で4日間連続投与した後、SRBC( $1 \times 10^8$ 個/マウス)で免疫し、その翌日からさらに3日間連続投与を行なった。免疫後4日目(最終投与の翌日)に脾臍を摘出し、直接ブラーク法により抗羊赤血球抗体産生細胞数を算定した。また、この際、マウスの体重、胸線ならびに脾臍の湿重量、脾臍細胞数および血中尿素窒素(BUN)値についても併せて測定した。

第9表

試験液	濃度 (mg/kg)	ブラーク数 (個/ $1 \times 10^8$ 個±SD)	抑制率 (%)	抑制率	
				1 L 6	+免疫抑制物質
-	-	-	-	1.2±2	2
-	-	-	-	2.06±1.2	0
2		6.0±8	75.3		
0.2		7.8±6	66.0		
0.02		1.08±1.0	50.5		
0.002		1.30±4	39.2		

実験2：

免疫実施日の前日および翌日に本発明の免疫抑制物質を2mg/kgの用量で2回投与し、免疫(SRBC,  $1 \times 10^8$ /マウス)後3日目(最終投与の翌々日)に脾臍を摘出し、直接ブラーク法により抗羊赤血球抗体産生細胞数を算定した。この際、マウスの体重、胸線ならびに脾臍の湿重量および脾臍細胞数についても併せて測定した。また、比較のためにサイクロスボリンA(CsA)と同じスケジュールで投与し、同様の測定を行なった。実験1および2で得られた結果を以下の表に示す。

(以下余白)

第10表

試験	②	試験液	体重 (g)	試験量 (kg)		脾臍細胞数 ( $\times 10^8$ 細胞) $\times 10^8$ 細胞	PFC数 $\times 10^4$ 細胞	BUN (mg/dl)
				免疫抑制物質	免疫抑制物質			
実験1	-	25.7	38.0	111.2	1.08	0.51	35.16	-
		±1.7	±11.2	±20.5	±0.07	±0.26	±0.19	±1.6
免疫抑制物質	26.5	33.9	131.3	0.91	0.25	0.27	31.0	-
	±0.5	±6.7	±10.1	±0.20	±0.03	±0.05	±0.4	
実験2	-	28.5	33.7	160.7	2.89	1.71	4.17	-
		±0.5	±7.7	±3.1	±0.53	±0.01	±0.75	
免疫抑制物質	27.0	51.6	167.3	2.98	1.03	3.04	-	
	±1.0	±2.1	±0.8	±0.03	±0.06	±0.14	±0.14	

第10表に示した様に、本発明の免疫抑制物質は、7日間連続投与(実験1)および免疫実施日前後の2回投与(実験2)のいずれにおいても抗羊赤血球抗体産生に対する抑制作用すなわち、単位脾臓細胞数(1×10<sup>7</sup>個)当たりのPFC数ならびに全脾臓細胞数当たりのPFC数を減少させる効果を示した。また、2回投与における単位脾臓細胞数当たりのPFC数では強力であった。

本発明の免疫抑制物質は、実験2において胸腺湿重量をやや減少させた以外は、体重、脾臓湿重量、脾臓細胞数およびBUN値に対してほとんど影響を及ぼさなかった。一方、サイクロスボリンAは、胸腺湿重量に加えて、脾臓湿重量ならびに脾臓細胞数を減少させる作用を示した。

#### 実験例11(マウスL929細胞に対する細胞毒性)

マウスL929細胞に対する細胞毒性は以下のよう検討した。

L929細胞を10%熱不活化牛胎児血清を含むF12培地で1.5×10<sup>3</sup>個/皿に調製し、96

穴マイクロテストプレートに100μlずつ加え、37℃5%炭酸ガス条件下で24時間培養した後に被検液100μlを加え、さらに48時間培養した。培養後、上清を100μl除去し、生細胞とインキュベートした際、ミトコンドリアのサクシネートデヒドロゲナーゼと反応し、暗青色のホルマゾン・プロダクトを生じることが報告されている(J. Immunol. Methods, 65巻, 55頁, 1983年)。

3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロマイド(MTT, 5mg/皿)20μlを加え、37℃、5%炭酸ガス条件下で4時間反応させ、ホルマゾンの結晶を形成させた後、10%ドデシル硫酸ナトリウムを含む0.01規定塩酸溶液100μlを結晶溶解のために加え、37℃で一晩放置し反応させた。反応終了後、各ウエルの上清100μlを吸光度測定用マイクロテストプレートに移し、マイクロテストプレート用分光光度計を用いて660nmを対照とした際の550nmにおける吸光度を測定した。以下の式により抑制率を算出し細胞

毒性の指標とした。

$$\text{抑制率} = 1 - \left( \frac{\text{被検体を添加した場合の吸光度}}{\text{被検体を未添加の場合の吸光度}} \right) \times 100\% \quad (1)$$

その結果を第11表に示す。

第11表

被検体	用量 (μg/皿)	吸光度	抑制率 (%)
—	—	0.669	—
免疫抑制物質	1	0.699	0
	10	0.693	0
	100	0.321	52.0

第11表から明らかなように、本発明の免疫抑制物質のマウスL929細胞に対する細胞毒性は、10μg/皿以下では全く認められなかった。

#### 実験例12(種々の培養腫瘍細胞株に対する細胞毒性の検討)

種々のヒト由来の培養腫瘍細胞株に対する細胞毒性の検討を以下のように行った。

ヒト由来の培養腫瘍細胞株K562、MOLT4、U937、HL60、KATOIII、KB、PC-6、PC-14およびCCR-F-CEMをそ

れぞれ20%牛胎児血清を含むRPMI1640培地にて2×10<sup>3</sup>個/皿に調製した。この細胞浮遊液50μlをあらかじめ被検液50μlを入れておいた96穴マイクロテストプレートの各ウエルに加えた。37℃、5%炭酸ガス条件下で72時間培養し、5mg/皿のMTT溶液20μlを加え、さらに同条件下で4時間培養した。生成したホルマゾンの結晶を10%ドデシル硫酸ナトリウムを含む0.01規定塩酸溶液100μlを加え、37℃で一晩放置し反応させた。反応終了後、各ウエルの上清の吸光度を実験例4と同様に測定した。その結果を示した第12表から明らかなように、本発明の免疫抑制物質の種々のヒト由来の培養腫瘍細胞株に対する細胞毒性は弱く、50%の抑制を与える濃度(IC<sub>50</sub>)は10μg/皿以上であった。

(以下余白)

第12表

細胞株	免疫抑制物質		
	用量 ( $\mu$ g/ml)	吸光度	抑制率 (%)
K562	0	0.990	—
	0.1	0.886	10.6
	1.0	0.905	8.6
	10.0	0.929	6.2
	100.0	0.583	41.1
MOLT4	0	0.618	—
	0.1	0.560	9.4
	1.0	0.559	9.5
	10.0	0.499	19.3
	100.0	0.074	88.0
U937	0	0.642	—
	0.1	0.619	3.6
	1.0	0.567	11.7
	10.0	0.497	22.6
	100.0	0.156	75.7
HL60	0	0.631	—
	0.1	0.402	36.3
	1.0	0.390	38.2
	10.0	0.377	40.3
	100.0	0.101	84.0
KATO III	0	0.961	—
	0.01	0.990	0
	0.1	0.972	0
	1.0	0.961	0
	10.0	0.869	9.6
	100.0	0.041	95.7

(第12表のつづき)

細胞株	免疫抑制物質		
	用量 ( $\mu$ g/ml)	吸光度	抑制率 (%)
KB	0	0.888	—
	0.01	0.898	0
	0.1	0.865	2.6
	1.0	0.879	1.0
	10.0	0.886	0.2
	100.0	0.025	97.2
PC-6	0	0.272	—
	0.01	0.244	10.3
	0.1	0.245	9.9
	1.0	0.209	23.2
	10.0	0.202	25.7
	100.0	0.000	100.0
PC-14	0	0.787	—
	0.01	0.801	0
	0.1	0.770	2.2
	1.0	0.732	7.0
	10.0	0.751	4.6
	100.0	0.074	90.6
CCRF-CBM	0	0.708	—
	0.01	0.678	4.2
	0.1	0.709	0
	1.0	0.660	6.8
	10.0	0.637	10.0
	100.0	0.013	98.2

## 〔発明の効果〕

上記実施例を含む明細書の記載から明らかなように、従来免疫抑制物質を生産することが知られていなかったイザリア属に属する菌から、すぐれた免疫抑制作用を有し、しかも類著な細胞毒性を発現しない物質、就中マイリオシンが生産された。

特許出願人 吉富製薬株式会社

台糖株式会社

代理人 弁理士 高島一



## 手続補正書(自発)

昭和63年3月23日

特許庁長官印

1. 事件の表示

63-50072

昭和63年3月2日付差出の特許願

2. 発明の名称

免疫抑制物質の製造法

3. 指定正をする者

事件との関係 特許出願人

名 称 吉富製薬株式会社

台糖株式会社

4. 代理人 ④541

住所 大阪市東区平野町4丁目56番地  
(湯木ビル)

TEL (06) 227-1156

高島国際特許事務所

氏名 弁理士 (8079) 高島



5. 指定正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄

6. 指定正の内容

(1) 明細書第5頁第3行の「Myoricio」を「Myriocin」に訂正する。

(2) 明細書第5頁第3行の「サーモフィミシディン」を「サーモザイモシディン」に訂正する。

(3) 明細書第5頁第4行の「Thermopymocidin」を「Thermozyomocidin」に訂正する。

(4) 明細書第8頁第4行の「フィトヘマグレチニン」を「フィトヘムアグレチニン」に訂正する。

正する。

- (5) 明細書第9頁第5行の「*2 p r i*」を「*2 p r*」に訂正する。
- (6) 明細書第11頁第20行の「のマウス」を「マウスの」に訂正する。
- (7) 明細書第13頁第11～12行の「(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)」を「(3-(4, 5-ジメチルアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロマイト)」に訂正する。
- (8) 明細書第13頁第16行および第17行の「well」を「ウェル」に訂正する。
- (9) 明細書第14頁下から第8行の「well」を「ウェル」に訂正する。
- (10) 明細書第15頁下から第16行の「懸濁」を「懸濁」に訂正する。
- (11) 明細書第15頁下から第14～15行の「10および1μg/mlの最終濃度で」を削除する。
- (12) 明細書第15頁下から第9行の「最後」を「最終」に訂正する。
- (13) 明細書第18頁第5行の「懸濁」を「懸濁」に訂正する。
- (14) 明細書第18頁第9行の「第2表に示した結果に基づき」を削除する。
- (15) 明細書第18頁第11行の「10<sup>-2</sup>」を「1/100」に訂正する。
- (16) 明細書第18頁第11行の「ことが明らかとなった」を削除する。

- (17) 明細書第20頁第12行の「10<sup>6</sup>」の後に「個」を加入する。
- (18) 明細書第23頁第5～6行の「ラット脾細胞コンカナバリンA (Con A)刺激培養上清の」を削除する。
- (19) 明細書第23頁第14行の「ラット脾細胞Con A 刺激」を「コンカナバリンA 刺激ラット脾細胞」に訂正する。
- (20) 明細書第37頁第16～17行の「またはサイクロスボリンA」を削除する。
- (21) 明細書第41頁第3行の「2回」を削除する。
- (22) 明細書第41頁第4行の「10<sup>7</sup>」の後に「個」を加入する。
- (23) 明細書第41頁第9行の「サイクロスボリンA (CsA)」を「シクロスボリンA」に訂正する。
- (24) 明細書第42頁の第10表を別紙の通り訂正する。
- (25) 明細書第43頁第12行の「サイクロスボリン」を「シクロスボリン」に訂正する。

(別紙)

第10表

被検体	体重 (g)	湿重量 (mg)		脾細胞数 (×10 <sup>6</sup> 細胞)	PHC数			BUN値 (mg/dl)
		胸膜	脾臓		×10 <sup>3</sup> /1×10 <sup>6</sup> 細胞	×10 <sup>4</sup> /脾臓		
実験1	—	25.7	58.0	111.2	1.09	0.59	0.51	35.6
		±1.7	±11.2	±20.5	±0.07	±0.26	±0.19	±1.6
	免疫抑制物質	26.5	53.9	131.3	0.91	0.25	0.27	31.0
		±0.5	±6.7	±10.1	±0.20	±0.03	±0.05	±0.4
実験2	—	28.5	69.7	160.7	2.89	1.47	4.17	—
		±0.5	±7.7	±3.1	±0.53	±0.01	±0.75	
	免疫抑制物質	27.0	51.6	167.3	2.98	1.03	3.04	—
		±1.0	±2.1	±0.8	±0.03	±0.06	±0.14	